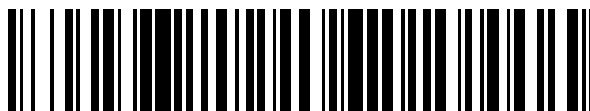


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 569**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2011 PCT/IB2011/052381**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2011 WO2011151783**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2011 E 11727547 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017 EP 2577316**

54 Título: **Método de ensayo de infección o inflamación de las vías respiratorias inferiores**

30 Prioridad:

31.05.2010 US 349909 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.06.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY HOSPITAL OF BASEL (50.0%)
Hebelstrasse 30
4031 Basel, CH y
SEPSTONE DIAGNOSTICS SARL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**STOLZ, DAIANA y
LAJAUNIAS, FRÉDÉRIC**

74 Agente/Representante:

LÓPEZ CAMBA, María Emilia

ES 2 619 569 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de ensayo de infección o inflamación de las vías respiratorias inferiores

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método de pronóstico o predicción de la supervivencia y/o diagnóstico de infecciones de las vías respiratorias inferiores y pulmones, en particular para el pronóstico del desarrollo de exacerbación aguda de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EAEPOC) o neumonía asociada al respirador (NAR). La invención permite la determinación del nivel de proteína de cálculos pancreáticos / proteína regeneradora (PSP/reg) en muestras de líquido corporal de un paciente y clasificar pacientes según riesgo.

Antecedentes de la invención

Las infecciones de las vías respiratorias inferiores, es decir, bronquitis aguda, exacerbaciones agudas de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o neumonía, representan casi el 10 % de la carga mundial de morbilidad y mortalidad. El detectar la presencia, definir la causa y predecir la gravedad de las infecciones de las vías respiratorias inferiores son retos constantes para el profesional clínico que trata. Entre los biomarcadores más comúnmente usados para la detección y el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias inferiores están los recuentos de leucocitos, proteína C reactiva y procalcitonina. Desafortunadamente, ninguno de estos biomarcadores es completamente satisfactorio.

La proteína de cálculos pancreáticos/proteína regeneradora (PSP/reg) pertenece a una familia de proteínas de unión a lectina que se identificaron inicialmente en pacientes con pancreatitis (L. Multigner et al., Gastroenterology 1985; 89:387-391). PSP/reg se ha estudiado predominantemente en el páncreas. En condiciones de pancreatitis aguda o crónica, está altamente regulada por incremento y puede aparecer en el suero (W. Schmiegel et al., Gastroenterology 1990; 99:1421-1430). Los niveles en suero también son elevados en varias enfermedades gastrointestinales (Satomura et al., J Gastroenterol 1995, 30:643-650). La función de PSP/reg es todavía altamente debatida, pero generalmente se supone que participa en promover la proliferación celular durante procesos regenerativos (Y. Kinoshita et al., J. Gastroenterol 2004, 39:507-513). Aunque esta proteína es un producto de secreción, su expresión no está inducida por la dieta sola. En pacientes con traumatismo, se ha mostrado que la PSP/reg está regulada por incremento en sangre después del traumatismo, y que el nivel de PSP/reg está relacionado con la gravedad de la inflamación. Se propuso un gen que codifica la isoforma alfa y beta de la proteína PSP/Reg y proteína en sí para ser los candidatos usados en los métodos de diagnóstico/pronóstico de enfermedad de asma (Database Geneseq, 18 September 2008, "Human asthma disease treatment associated protein, SEQ ID 698"; documento WO 2008/085601). Se ha mostrado que los niveles de proteína Reg (es decir, PSP/reg) aumentan en el suero de pacientes con fibrosis quística (Carrere et al. (1999) Gut, 44(4), 545-551). En particular, es altamente elevada en pacientes durante sepsis (M. Keel et al., Crit Care Med. 2009 37(5):1642-8).

40 Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un método de predicción y/o diagnóstico de infecciones de las vías respiratorias inferiores y pulmones en ser humano, en particular para la predicción del desarrollo y la gravedad y pronóstico de infección de las vías respiratorias inferiores que incluye EPOC o NAR, en la que el nivel de PSP/reg se determina en una muestra de líquido corporal, y un alto nivel es indicativo del desarrollo y la gravedad de infecciones de las vías respiratorias inferiores en fases tempranas de la enfermedad. Además, en la presente invención, altos niveles de PSP/reg son predictivos de supervivencia en neumonía adquirida por respirador y se correlacionan con la puntuación clínica. Por tanto, altos niveles de PSP/reg permiten detectar pacientes con EPOC con microbiología de esputo positiva.

50 Descripción de las figuras

Figura 1: Correlación de SOFA y ln(niveles en suero de PSP/reg) en la aparición de NAR ($p < 0,001$) en 101 pacientes con NAR. Se hizo el logaritmo de PSP/reg para la demostración gráfica. Línea de regresión (línea discontinua).

Figura 2: Cinética de los niveles en suero de PSP/reg en los grupos de supervivientes (S; $n=82$) y no supervivientes (NS; $n=19$) en un total de 101 pacientes con NAR durante los 7 primeros días (d) después de la aparición de NAR. Los recuadros representan el intervalo intercuartílico (IQR), los bigotes incluyen 1,5 veces el intervalo intercuartílico. Para una clara presentación gráfica no se presentan los valores atípicos. La mortalidad se midió en el día 28.

Figura 3: PSP/reg en el análisis de la curva de eficacia diagnóstica (ROC): en el día 0 para predecir supervivencia (A), en el día 7 para predecir muerte (B). Los círculos resaltan los cortes más precisos. Usar el corte de 24 ng/ml en la aparición de NAR revela una sensibilidad del 36 % y una especificidad del 100 % para predecir la supervivencia (ABC: 0,69; Figura 3A). 177 ng/ml en el día 7 fue el mejor umbral para predecir la muerte con una sensibilidad del 54 % y una especificidad del 90 % (ABC: 0,76; Figura 3B).

Figura 4: Niveles en suero de PSP/reg en la exacerbación de la EPOC según bacteriología del esputo. Los pacientes con bacteriología del esputo positiva (P; $n=62$) tuvieron niveles en suero significativamente más altos de PSP/reg en

comparación con pacientes con bacteriología del esputo negativa (N; n= 43) (26,7 ng/ml [19,3-38,8] frente a 20,8 [15,3-27,2], p= 0,005).

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se refiere a un método de pronóstico y/o diagnóstico de infecciones de las vías respiratorias inferiores y pulmones en seres humanos en el que el nivel de proteína de cálculos pancreáticos / proteína regeneradora (PSP/reg) se determina en una muestra de líquido corporal, y un alto nivel es indicativo del desarrollo y la gravedad de la enfermedad. En un primer aspecto, la invención se refiere a un método *ex vivo* de detección y/o
10 diagnóstico de infecciones de las vías respiratorias inferiores y pulmones en seres humanos. En particular, el presente método según la invención permite la predicción de la gravedad y el pronóstico de infecciones de las vías respiratorias inferiores que incluye EPOC y NAR. Los métodos según la presente invención comprenden determinar el nivel de PSP/reg en una muestra de líquido corporal aislada, por ejemplo suero, en el que dicho nivel es indicativo de la gravedad de las infecciones de las vías respiratorias inferiores en fases tempranas de la enfermedad y de las complicaciones y el riesgo de mortalidad asociados a dichas infecciones.
15

Como se define en la presente, "paciente" se refiere a cualquier animal mamífero que incluye ser humano, perro, gato, ganado vacuno, cabra, cerdo, cerdo, oveja y mono. Los pacientes son preferentemente seres humanos.

20 Como se define en la presente, "infección de las vías respiratorias inferiores" se refiere a una infección en las vías respiratorias inferiores o pulmones producida por bacterias, virus, hongos o parásitos. Incluye, por ejemplo, bronquitis aguda y crónica, neumonía extrahospitalaria, que puede producirse, entre otros, por *Streptococcus pneumoniae*, bacterias atípicas, bacterias Gram-negativas, o *Haemophilus influenzae*, neumonía intrahospitalaria tal como neumonía asociada al respirador (NAR), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), exacerbación
25 aguda de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EAEPOC), bronquiectasia que incluye fibrosis quística y enfermedad pulmonar intersticial.

Como se define en la presente, "neumonía asociada al respirador (NAR)" es una neumonía que se desarrolla 48 horas o más después de ventilación mecánica y que se caracteriza por una invasión de las vías respiratorias inferiores y parénquima pulmonar por microorganismos. NAR es una afección médica potencialmente grave que puede conducir a sepsis mediante el desarrollo de una infección sistémica que afecta a varios órganos y tejidos, o afecta al cuerpo en conjunto.
30

Como se define en la presente, la "enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)" se caracteriza por una obstrucción grave de las vías respiratorias que produce una respuesta inflamatoria anormal en el pulmón. Generalmente, los pacientes sufren exacerbaciones que pueden ser desencadenadas por infección o contaminación del aire, y que conducen a EAEPOC (exacerbación aguda de la EPOC), una afección crítica que requiere hospitalización. La EPOC puede clasificarse en 4 etapas correlacionadas con la gravedad (menor, moderada, grave y muy grave) (Gomez y Rodriguez-Roisin, Curr. Opin. Pulm. Med. 2002: 8(2): 81-86).
35

Como se define en la presente, la "exacerbación aguda de la EPOC (EAEPOC)" es un empeoramiento repentino de los síntomas de EPOC, como disnea, cantidad y color de flema, que normalmente dura durante varios días. Puede ser desencadenada por una infección con bacterias o virus o por contaminantes medioambientales.
40

45 En NAR, la infección se produce como consecuencia de cirugía, en particular como consecuencia de una intubación para ventilación mecánica dada por medio de un tubo endotraqueal o traqueotomía. En EPOC, la infección también puede producirse como consecuencia de una obstrucción de las vías respiratorias en el pulmón. La infección puede originarse a partir de las vías respiratorias.

50 Como se define en la presente, PSP/reg se refiere a proteína de cálculos pancreáticos humana, también llamada proteína del gen regenerador (REG) I o litostatina o proteína de la hebra pancreática (Gross al., J. Clin. Invest., 1985: 76; 2115-2126) y puede ser la isoforma alfa (número de secuencia de Uniprot: P05451 también identificada en la presente como SEQ ID NO. 1) o beta (número de secuencia de Uniprot: P48304 también identificada en la presente como SEQ ID NO. 2).
55

Como se define en la presente, muestra de cuerpo se refiere a cualquier muestra que se obtiene del cuerpo del paciente. La muestra de cuerpo incluye muestras de líquido corporal y extractos de tejido sólido o de materia fecal. Las muestras de líquido corporal incluyen, por ejemplo, muestras de sangre completa, suero, plasma, orina, esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido lacrimonal, sudor o leche.
60

Un aspecto de la invención se refiere a un método de pronóstico y/o diagnóstico de infecciones de las vías respiratorias inferiores y pulmones en un paciente, preferentemente un ser humano, en el que el nivel de proteína de cálculos pancreáticos / proteína regeneradora (PSP/reg) se determina en una muestra de líquido corporal o en un tejido del cuerpo sólido, y un alto nivel es indicativo del desarrollo y la gravedad de la enfermedad.
65

En un aspecto adicional del método de la invención, la infección en las vías respiratorias inferiores o pulmones se

produce por bacterias, virus, hongos o parásitos, y está seleccionada del grupo de infecciones de las vías respiratorias inferiores, particularmente bronquitis aguda y crónica, exacerbación aguda de la EPOC, EPOC estable, neumonía extrahospitalaria o intrahospitalaria o asociada al respirador, sarcoidosis, bronquiectasia, que incluye fibrosis quística y enfermedad pulmonar intersticial y asma.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *ex vivo* de pronóstico y/o diagnóstico de infecciones de las vías respiratorias inferiores y pulmones en un paciente, o un método *ex vivo* de detección del desarrollo de infecciones de las vías respiratorias inferiores y pulmones en un paciente, que comprende determinar el nivel de proteína de cálculos pancreáticos / proteína regeneradora (PSP/reg) en una muestra de líquido corporal de dicho paciente. El paciente es preferentemente un ser humano.

10 En otro aspecto del método de la invención, la proteína PSP/reg tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO: 2.

15 En un aspecto preferido, el método de la invención es para el diagnóstico y el pronóstico de infección de las vías respiratorias inferiores, preferentemente neumonía, preferentemente NAR o EPOC y EAEPOC.

Según un aspecto adicional, el método de la invención es un método *in vitro* de diagnóstico.

20 En un aspecto todavía adicional, la presente invención se refiere a un método *ex vivo* de pronóstico y/o diagnóstico de infecciones de las vías respiratorias inferiores y pulmones en un paciente, o a un método *ex vivo* de detección del desarrollo de infecciones de las vías respiratorias inferiores y pulmones en un paciente, que comprende:

- 25 a) proporcionar una muestra de líquido corporal de dicho paciente;
 b) determinar el nivel de PSP/reg en dicha muestra;
 c) comparar el nivel de PSP/reg determinado en la etapa b) con un valor de referencia;

en el que un nivel más alto de PSP/reg determinado en la etapa b), en comparación con el valor de referencia, es indicativo de la gravedad de la infección y predictivo del resultado.

30 Según otro aspecto de la invención, el método de la invención es un método *in vitro* de diagnóstico.

35 En un aspecto específico de la invención, el valor de referencia es el nivel de PSP/reg medido en una muestra de líquido corporal de un paciente sin infección conocida o sospechada. En otro aspecto de la invención, el valor de referencia es aproximadamente 10 ng/ml.

En un aspecto adicional de la invención, el valor de referencia es 25 ng/ml. En un aspecto todavía adicional de la invención, el valor de referencia es 180 ng/ml, más preferentemente 200 ng/ml.

40 En otro aspecto específico de la invención, la muestra de líquido corporal es suero o plasma. Otros líquidos corporales distintos de suero y plasma útiles para la determinación de los niveles de PSP/reg son, por ejemplo, sangre completa, orina, esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido lacrimonal, sudor, leche, o extractos de tejido sólido o de materia fecal.

45 En pacientes con EPOC, el nivel de PSP/reg indicativo de exacerbación bacteriana en suero y plasma sanguíneos es de, o aproximadamente, 25 ng/ml o superior a 25 ng/ml en la exacerbación. Por lo tanto, más específicamente, la invención se refiere a un método de detección de la presencia de esputo bacteriano positivo como causa de la exacerbación, en el que el nivel de PSP/reg se determina preferentemente en suero o plasma, y un nivel de, o aproximadamente, 25 ng/ml o más, es indicativo de microbiología de esputo positiva. Preferentemente, un nivel de
 50 PSP/reg en suero o plasma que es igual a, o superior a, aproximadamente 30 ng/ml es indicativo de exacerbación bacteriana en pacientes con EPOC.

Por tanto, preferentemente, el nivel de PSP/reg se determina en la exacerbación de la EPOC, o en el día de ingreso en el hospital tras la exacerbación.

55 En pacientes con NAR, el nivel de PSP/reg indicativo de complicaciones graves y desenlace del paciente, en suero y plasma en sangre, es de o aproximadamente 180 ng/ml o superior a 180 ng/ml en la aparición de NAR, o en el día 2, 3, 4, 5, 6, 7, después de una aparición de NAR que se produjo en el día 0. Por lo tanto, más específicamente, la invención se refiere a un método para identificar individuos con un desenlace bueno y malo particular y, por lo tanto,
 60 para predecir gravedad de infección, en el que el nivel de PSP/reg se determina en suero o plasma. Un nivel de PSP/reg en suero o plasma de, o inferior a, 24 ng/ml está asociado con una buena probabilidad de supervivencia, mientras que un nivel de PSP/reg de, o superior a, 180 ng/ml es indicativo de un desenlace muy malo y riesgo alto de mortalidad. Preferentemente, un nivel de PSP/reg de aproximadamente, o superior a, 200 ng/ml o más preferentemente superior a 250 ng/ml es indicativo de complicaciones graves y mal desenlace. Preferentemente, el
 65 nivel de PSP/reg se determina en la exacerbación o en el día 2, 3, 4, 5, 6, 7 después de la aparición de NAR.

En un aspecto preferido del método *ex vivo* de la invención, el nivel de PSP/reg determinado en la etapa b) se determina en el día de la aparición de NAR o en el día 2, 3, 4, 5, 6, 7 después de la aparición en comparación con un valor de referencia de, o aproximadamente, 10 ng/ml.

- 5 En un aspecto preferido alternativo del método *ex vivo* de la invención, el nivel de PSP/reg determinado en la etapa b) se determina en el día de, o en el día de ingreso en el hospital para, la exacerbación de la EPOC en comparación con un valor de referencia de, o aproximadamente, 10 ng/ml.

Puede usarse cualquier método conocido para la determinación del nivel de PSP/reg en líquidos corporales. Métodos considerados son, por ejemplo, enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), enzimoimmunoensayo (EIA), espectrometría de masas, o análisis de micromatrices. Tales métodos, cuando se usan para la detección del desarrollo de infección local o sistémica, en particular de la detección del desarrollo de sepsis, son otro objetivo de la invención.

- 15 Un método preferido para la determinación de PSP/reg en fluidos del cuerpo humano, por ejemplo suero o plasma, es un ELISA. En una realización de la invención, el ELISA de PSP/reg consiste en una matriz de sándwich: placas de microtitulación convencionales se recubren con un tipo de anticuerpo ("primer" anticuerpo) dirigido contra PSP/reg. Las placas se bloquean entonces y se carga la muestra o patrón. Después de la incubación, se aplica un tipo diferente de anticuerpo ("segundo" anticuerpo) contra PSP/reg conjugado con una marca adecuada, por ejemplo una enzima para la detección cromogénica. Finalmente, la placa se desarrolla con un sustrato para la marca con el fin de detectar y cuantificar la marca, que es una medida de la presencia y cantidad de PSP/reg. Si la marca es una enzima para detección cromogénica, el sustrato es un sustrato generador de color de la enzima conjugada. La reacción de color se detecta entonces en un lector de microplacas y se compara con patrones.

- 25 Pares de anticuerpos adecuados ("primer" y "segundo" anticuerpo) son cualquier combinación de cobaya, rata, ratón, conejo, cabra, pollo, burro o caballo. Se prefieren anticuerpos monoclonales, pero también es posible usar anticuerpos policlonales o fragmentos de anticuerpos. Marcas adecuadas son marcas cromogénicas, es decir, enzimas que pueden usarse para convertir un sustrato en un compuesto coloreado o fluorescente detectable, marcas espectroscópicas, por ejemplo marcas fluorescentes o marcas que presentan un color visible, marcas de afinidad que pueden desarrollarse por otro compuesto específico para la marca y permitir la fácil detección y cuantificación, o cualquier otra marca usada en ELISA estándar.

- Otros métodos preferidos de detección de PSP/reg son radioinmunoensayo o inmunoensayo competitivo usando un único anticuerpo y detección por quimioluminiscencia en robots analíticos comerciales automatizados. También puede usarse fluorescencia potenciada de micropartículas, metodologías polarizadas de fluorescencia, o espectrometría de masas. Los dispositivos de detección, por ejemplo micromatrices, son componentes útiles como sistemas de lectura para PSP/reg.

- PSP/reg es una proteína que puede clonarse de ARNm pancreático y subclonarse en un vector de expresión en levadura. La proteína puede entonces expresarse bajo el control del promotor del alcohol deshidrogenasa (ADH). Un medio de expresión adecuado puede comprender metanol para inducir y mantener la secreción de PSP/reg. PSP/reg se purifica preferentemente usando SP-Sepharose-celulosa por un gradiente de pH y de sal. Tal PSP/reg purificada se usa para preparar disoluciones estándar para la comparación con niveles de PSP/reg en líquidos corporales. Pueden obtenerse anticuerpos policlonales contra la proteína de ratones, ratas, conejos, cabras, pollo, burro, caballos y cobayas u otros animales adecuados usando métodos convencionales.

- 45 Pueden producirse anticuerpos dirigidos contra PSP/reg por métodos convencionales en el campo que incluyen producción de anticuerpos policlonales, producción de anticuerpos monoclonales. Preferentemente, los anticuerpos se dirigen contra una proteína PSP/reg que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO: 2.

- 50 Se muestra que el nivel de PSP/reg es altamente elevado en pacientes durante NAR con riesgo elevado de mortalidad y en el caso de exacerbación de la EPOC bacteriana. La detección y cuantificación de PSP/reg en suero se lleva a cabo, por ejemplo, por un ELISA de sándwich. Valores en suero normales son aproximadamente 10 ng/ml. En NAR, los valores en suero se correlacionan con la gravedad de NAR y pueden alcanzar más de 200 ng/ml. Estos valores permiten predecir si un paciente con NAR tiene una buena o mala probabilidad de supervivencia. En EPOC, los valores de PSP/reg en suero se correlacionan con la presencia de esputo bacteriano positivo y están por encima de 25 ng/ml. En tanto NAR como EPOC, valores de PSP/reg respectivos permiten predecir la necesidad de un tratamiento intensivo que incluye un costoso tratamiento con antibióticos y estancia prolongada en la unidad de cuidados intensivos. En comparación con los ensayos de diagnóstico comercialmente disponibles, el ELISA de PSP/reg es un ensayo fiable para predecir la gravedad y el desenlace en el paciente con NAR, y para diagnosticar exacerbación de la EPOC bacteriana.

El método de la invención es útil para clasificar los pacientes según grupos de riesgos referentes a la gravedad y el desenlace de la infección.

- 65 En pacientes con NAR, un nivel de PSP/reg, preferentemente de una muestra obtenida del suero o plasma de un paciente con NAR inferior o igual a 24 ng/ml es predictivo de una buena probabilidad de supervivencia, mientras que

un nivel de PSP/reg superior o igual a 150 ng/ml, preferentemente superior a 180 ng/ml, más preferentemente superior o igual a 200 ng/ml, más preferentemente superior o igual a 250 ng/ml, está asociado a un riesgo alto de mortalidad que podría producirse dentro de un periodo variable comprendido entre 1 día y 3 años, por ejemplo en el plazo de 28 días después de la hospitalización.

5 Como consecuencia, debe aplicarse seguimiento y cuidado regular e intensivo, que posiblemente incluye tratamiento con antibióticos y estancia prolongada, a pacientes con NAR que pertenecen al (a los) grupo(s) de riesgo(s) alto(s).

10 En pacientes con EPOC, un nivel de PSP/reg, preferentemente de una muestra obtenida del suero o plasma de un paciente con EPOC, inferior a 25 ng/ml, más preferentemente inferior a 20 mg/ml, está asociado a un esputo bacteriano negativo, mientras que un nivel de PSP/reg igual o superior a 25 ng/ml, preferentemente igual o superior a 30 ng/ml, más preferentemente igual o superior a 50 ng/ml, es indicativo de exacerbación bacteriana. Con respecto a la mortalidad de pacientes con EPOC, un nivel de PSP/reg, preferentemente de una muestra obtenida del suero o plasma de un paciente con EPOC, inferior a 18 ng/ml, preferentemente inferior a 15 ng/ml, está asociado a un bajo riesgo de mortalidad, mientras que un nivel de PSP/reg superior a 30 ng/ml, preferentemente superior a 34 ng/ml o más preferentemente superior a 35 ng/ml, está asociado a un riesgo alto de mortalidad que podría producirse en el plazo de un periodo variable comprendido entre 1 día y 3 años, por ejemplo en el plazo de 2 años después de la hospitalización.

20 Como consecuencia, debe aplicarse seguimiento y cuidado regular e intensivo, que posiblemente incluye tratamiento con antibióticos y estancia prolongada, a pacientes con EPOC que pertenecen al (a los) grupo(s) de riesgo(s) alto(s).

EJEMPLOS

25 **Ejemplo 1: PSP/reg es un marcador adecuado para evaluar la gravedad de la enfermedad y estratificar el riesgo en NAR**

Se ha investigado si PSP/reg es predictivo de la supervivencia en neumonía asociada al respirador.

30 *Pacientes de prueba*

El estudio incluyó 101 pacientes (edad media, 56 años) con NAR clínicamente diagnosticado. Los pacientes muertos en el plazo de 28 días se clasificaron como no supervivientes (NS). Se obtuvieron niveles de PSP/reg y puntuaciones de evaluación de insuficiencia orgánica secuencial (SOFA) en el día de la aparición de NAR y durante 10 días consecutivos. Características iniciales detalladas para supervivientes y no supervivientes se resumen en la Tabla 1. A pesar del alto pre-tratamiento con antibióticos en el plazo de 14 días antes de la inclusión del estudio (75 %), se identificaron especímenes respiratorios identificados como un organismo causante en 74 pacientes (76 %). Los patógenos más frecuentes fueron *Staphylococcus aureus* (30 %), *Pseudomonas aeruginosa* (25 %) y especies de *Klebsiella* (13 %). La terapia con antibióticos inicial apropiada, definida como una pauta que combina un aminoglucósido o una fluoroquinolona más una betalactama o un carbapenem anti-*Pseudomonas* se aplicó en el 86 % de los casos. Veinte pacientes (20 %) murieron durante el periodo de estudio. Las muertes fueron debidas a lesión cerebral traumática/hemorragia subaracnoidea (n=8), insuficiencia respiratoria/síndrome disneico agudo (SDA) (n=5), choque séptico (n=3), choque cardiogénico (n=2), insuficiencia multiorgánica (n=1) e insuficiencia hepática aguda (n=1). En 7 pacientes faltaron los valores de PSP/reg en la aparición de NAR.

45

Tabla 1: Características demográficas de 101 pacientes con NAR en la inclusión del estudio

Características	Total n=101	Supervivientes n=81	No supervivientes n=20	Valor de p
Sexo (masculino) (%)	74 (74 %)	61 (76 %)	13 (65 %)	0,459
Edad (en años) (intervalo)	57 [43-70]	55 [42-68]	67 [52-75]	0,033
Ingreso				
Médico	53 (53 %)	41 (51 %)	12 (60 %)	0,615
Cirugía electiva	4 (4 %)	4 (5 %)	0 (0 %)	0,582
Cirugía de emergencia	43 (43 %)	35 (43 %)	8 (40 %)	0,994
Desde casa	61 (62 %)	51 (65 %)	10 (47 %)	0,291
Desde el hospital	20 (20 %)	15 (19 %)	5 (24 %)	0,517
De otra UCI	18 (18 %)	12 (15 %)	6 (29 %)	0,114
Duración de la ventilación mecánica antes de NAR (en días) (intervalo)	6 [3,5-9]	6 [3-9]	5,5 [4-9,8]	0,801
Antibióticos en el plazo de 14 días antes de la aparición de NAR	76 (75 %)	59 (73 %)	17 (85 %)	0,387
Microbiología				
Cultivos microbiológicos positivos (EA, BAL, PSB)	74 (76 %)	58 (73 %)	16 (89 %)	0,226

Cultivos de sangre positivos	34 (34 %)	29 (36 %)	5 (25 %)	0,515
Puntuaciones clínicas en la aparición de NAR				
SAPS II	40,5 [32,3-51]	38,0 [31-47,0]	48 [42,0-55]	0,002
Puntuación de ODIN	2 [1-3]	2 [1-2]	3 [1-4]	0,050
Puntuación de SOFA	7,0 [6,0-9,8]	6,0 [5-9]	9,0 [7,0-14]	0,002

Los valores son medias
 (): porcentaje de valores
 []: intervalo
 EA: aspirados endotraqueales
 BAL: lavado broncoalveolar
 PSB: cepillo de espécimen protegido
 SAPS II: puntuación fisiológica aguda simplificada II
 ODIN: disfunción orgánica y/o infección
 SOFA: evaluación de la insuficiencia orgánica relacionada con la sepsis

Evaluación del nivel inicial y seguimiento

En el momento del enrolamiento se registró la siguiente información de cada sujeto: edad, sexo, comorbilidades preexistentes, motivo primario para iniciar la ventilación mecánica, duración de la ventilación mecánica previa, uso de antibióticos en el plazo de 14 días desde la aparición de NAR, temperatura corporal, frecuencia cardíaca, presión arterial media (PAM), saturación de oxígeno, relación de la presión parcial del oxígeno arterial con respecto a la fracción de oxígeno inspirado (PaO_2/FIO_2), recuento de leucocitos (WBC) y niveles en suero de PSP/reg. Se calcularon los siguientes índices: puntuación fisiológica aguda simplificada II (SAPS II), puntuación de la evaluación de la insuficiencia orgánica relacionada secuencial (SOFA), puntuación de disfunción orgánica y/o infección (ODIN). Para el periodo de 28 días de seguimiento se registró la siguiente información: temperatura corporal, frecuencia cardíaca, MAP, saturación de oxígeno, PaO_2/FIO_2 , WBC, SOFA y ODIN; estado de la ventilación mecánica y uso de antibióticos y supervivencia durante todo el periodo de estudio de 28 días. Se determinaron los niveles de PSP/reg en suero en la aparición de NAR y durante 6 días consecutivos después del diagnóstico de NAR.

15 *Criterios de diagnóstico*

Se estableció el diagnóstico de NAR en un enfoque clínico según las Directrices de la Sociedad Torácica Americana (Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 2005; 171:388-416). Se definió como un nuevo infiltrado o progresivo en la radiografía torácica asociada a al menos dos de lo siguiente: secreciones de tráquea purulentas, fiebre (temperatura corporal $>38\text{ }^\circ\text{C}$ / $100,4\text{ }^\circ\text{F}$), leucocitosis/-penia (recuento de leucocitos $>11.000/\mu\text{l}$ o $<3.000/\mu\text{l}$). Pacientes con NAR fueron elegibles para el estudio si se intubaron para ventilación mecánica durante al menos 48 horas y mayores de 18 años. Se excluyeron los pacientes si estaban embarazadas, habían recibido inmunosupresores o terapia con corticosteroides a largo plazo (por encima de 0,5 mg/kg por día durante más de 1 mes), estaban inmunosuprimidos o tuvieron una infección extrapulmonar coexistente diagnosticada en los tres primeros días que requiriera terapia con antibióticos durante más de tres días.

Evaluación del desenlace

30 El seguimiento fue durante 28 días o hasta la muerte. Los pacientes que murieron en el plazo de 28 días después de la aparición de NAR se clasificaron como no supervivientes (NS), todos los otros se clasificaron como supervivientes (S). Ningún paciente se perdió para seguimiento.

PSP/reg se correlacionó con SOFA

35 La mediana [IQR] de PSP/reg en la aparición de NAR fue 38,6 ng/ml [22,2-179,0]. No hubo asociación de PSP/reg con el sexo, co-morbilidades (renal, pulmonar, cardíaca, hematológica/oncológica) e intercambio de gas (saturación de oxígeno, PaO_2/FIO_2).

40 PSP/reg se correlacionó con SOFA en la aparición de NAR (coeficiente de correlación de rangos de Spearman 0,49; $p<0,001$, figura 1) y hasta siete días (todos $p<0,02$).

Los niveles de PSP/reg son factor pronóstico de desenlace

45 Se midieron las concentraciones de PSP/reg en el suero o plasma por inmunoensayo (método de ELISA).

50 Los niveles de PSP/reg en la aparición de NAR fueron significativamente elevados en no supervivientes (mediana [IQR]; 117,0 ng/ml [36,1-295,3], $n=19$) en comparación con los supervivientes (36,3 ng/ml [21,0-124,0], $n=75$; $p=0,011$) (Figura 2). Los terciles de PSP/reg en la aparición de NAR difirieron significativamente en la supervivencia (rango logarítmico $p=0,014$). En el análisis de la curva de eficacia diagnóstica, el área bajo la curva de PSP/reg para la mortalidad/supervivencia en la aparición de NAR y después de 7 días fueron 0,69 y 0,76 (intervalo de confianza

del 95 % (IC): 0,57-0,80 y 0,62-0,91), respectivamente (Figura 3). PSP/reg inferior a 24 ng/ml en la aparición de NAR fue el umbral más preciso para predecir la supervivencia. La sensibilidad fue del 36 % y la especificidad del 100 % para predecir la supervivencia (Figura 3A). A diferencia, PSP/reg por encima de 177 ng/ml en el día 7 después de la aparición de NAR fue el mejor corte para predecir la muerte (sensibilidad: 58 % especificidad: 91 %) (Figura 3B).
 5 Valores predictivo positivos y negativos fueron 54 % y 90 %, por consiguiente. La razón de probabilidades para pacientes PSP/reg por encima de 177 ng/ml en el día 7 con respecto a la muerte hasta el día 28 fue 13,8 (intervalo de confianza del 95 % (IC): 3,3-57,1).

Ejemplo 2 - PSP/reg aumenta en exacerbaciones agudas de EPOC con cultivo de esputo positivo

10 Se ha investigado si PSP/reg en suero y plasma aumenta en exacerbaciones agudas de EPOC y si PSP/reg detecta esputo positivo en EPOC.

Pacientes de prueba

15 Se examinaron 200 pacientes ingresados en el hospital para exacerbación aguda de la EPOC y fueron seguidos durante 2 años. Las visitas de seguimiento a corto y largo plazo se realizaron 14-18 días, 6 meses y 2 años después del ingreso hospitalario, y comprendieron evaluaciones clínicas, de laboratorio y de la función pulmonar. Se obtuvieron datos de resultados clínicos de historias clínicas del ingreso hospitalario y médicos de familia. Los
 20 pacientes se clasificaron como éxito clínico y fracaso clínico. El fracaso clínico se definió por la aparición de una exacerbación de la EPOC que requirió hospitalización o muerte de cualquier causa. Para el análisis de supervivencia todos los pacientes se clasificaron como supervivientes o no supervivientes, después del seguimiento de dos años. Toda causa de mortalidad se evaluó a los 6 meses y 2 años. Para los biomarcadores inflamatorios de desenlace a corto y largo plazo de laboratorio (por ejemplo (PSP/reg), procalcitonina, proteína C reactiva (CRP)), se midieron en
 25 el ingreso hospitalario inicial y durante la evolución adicional. Los niveles de PSP/reg se midieron en suero y plasma en el ingreso y después de 14-18 días.

Población del estudio

30 Se presentan características del nivel inicial detalladas de los 200 pacientes en la Tabla 2. Como se sugirió por la clasificación de GOLD (Gomez y Rodriguez-Roisin, Curr. Opin. Pulm. Med. 2002: 8(2): 81-86), la gravedad de EPOC como se evaluó a los 14 días fue leve en 24 (12 %) pacientes (estadio I) y moderada en 41 (21 %) (estadio II). La mayoría de los pacientes tuvieron EPOC grave o muy grave con estadio III en 82 (42 %) y estadio IV en 50
 35 pacientes (25 %). Hubo 100 (50 %) exacerbaciones tipo I, 44 (22 %) tipo II y 56 (28 %) tipo III según los criterios de Anthonisen (Anthonisen et al. Ann. Intern. Med. 1987: 106(2): 196-204). Estuvo presente elevada producción de esputo y esputo descolorido en 139 (69,5 %) y 116 (58 %) pacientes, respectivamente. 154 pacientes (77 %) tuvieron al menos una exacerbación. En el ingreso, las muestras de esputo para microbiología se obtuvieron de 113
 40 pacientes (56,5 %). Las muestras de esputo de 8 pacientes (7 %) fueron de mala calidad y se excluyeron del análisis. Los cultivos de esputo cultivaron patógenos bacterianos en 63 (56 %) de casos. 42 pacientes (37 %) tuvieron cultivos de esputo bacteriano negativo. Se trataron con antibióticos 42 pacientes (68 %) con especímenes de esputo positivos.

Tabla 2: Características iniciales de 200 pacientes que presentaron una exacerbación aguda de la EPOC

Características	N=200
Sexo (masculino/femenino) (%)	114/86 (57/43)
Edad (en años) (intervalo)	70,4 (42-91)
Duración media de la EPOC (en meses) (DE)	125,6 (+/-83,2)
Duración de EAEPOC (en días) (SD)	6,9 (+/-10)
EAEPOC en el año previo (al menos una) (%)	154 (77)
Gravedad de EPOC y estadio GOLD (%)	
I (FEV1 % > 80 % predicho)	24 (12)
II (50 % pred.> FEV1 % < 80 % pred.)	41 (21)
III (30 % pred.> FEV1 % < 50 % pred.)	82 (42)
IV (FEV1 % < 30 % pred.)	50 (25)
FEV1 predicho (%) (DE)	40 (+/-18,3)
FEV1 (litro) (DE)	1,07 (+/-0,52)
Química:	
Recuento de leucocitos x 10 ⁹ /l	11,1 (+/-4,8)
Proteína C reactiva (CRP) mg/dl (DE)	35,1 (+/-46,4)
Procalcitonina ng/dl (SD)	0,26 (+/-0,82)
Los valores son números absolutos (%) o medias (desviación estándar), cuando no se indica de otro modo, DE= desviación estándar; EAEPOC indica exacerbación aguda de enfermedad pulmonar obstructiva crónica; FEV1= volumen espiratorio máximo en un segundo	

Niveles en suero y plasma de PSP/reg en EAEPOC y recuperación

Añadir una breve descripción sobre cómo se midieron los niveles de PSP/reg, de qué tipo de muestra.

5 Se midieron concentraciones de PSP/reg en el suero o plasma por inmunoensayo (método de ELISA)

10 En comparación con controles sanos (10,4 [7,5-12,3] ng/ml, n=38), PSP/reg aumentó significativamente en el ingreso para exacerbación aguda de la EPOC (24,3 [18,4-34,5] ng/ml). Sin embargo, no hubo diferencia entre niveles de PSP/reg en la exacerbación y en la recuperación (p=0,434). Los niveles de PSP/reg difirieron significativamente a través de los estadios de GOLD (p=0,011). Hubo una buena correlación positiva entre niveles en suero de PSP en el ingreso inicial y la gravedad de EPOC como se sugirió por la clasificación de GOLD (p=0,016). Los niveles medios en suero de PSP/reg fueron 20,4 ng/ml [16,9-33,6] para GOLD I, 23,8 ng/ml [18,8-32,8] para GOLD II, 26,4 ng/ml [20,6-38,8] para GOLD III y 20,8 ng/ml [16,3-29,3] para GOLD IV. Los niveles de PSP/reg se correlacionaron con proteína C reactiva (p=0,031) y procalcitonina (p<0,001).

15 *Niveles en suero y plasma de PSP/reg y bacteriología positiva del esputo*

20 Los pacientes con cultivos bacterianos de esputo positivo y negativo se diferenciaron significativamente con respecto a los valores en suero de PSP/reg. Los pacientes con microbiología de esputo positivo tuvieron niveles de PSP/reg (26,7 ng/ml [19,2-38,5] frente a 20,8 ng/ml [15,6-27,2], p=0,008) más altos (Figura 4).

PSP/reg y duración de la estancia hospitalaria y mortalidad de 2 años

25 Los niveles de PSP/reg en la exacerbación se correlacionaron significativamente con la longitud de la estancia hospitalaria (r=0,231; p =0,001). Pacientes con niveles de PSP/reg < centil 25 (<18,36 ng/ml) tuvieron una estancia hospitalaria media de 6,9 días (± 7,62) en comparación con 11,34 días (± 7,42) en pacientes que presentan niveles > centil 75 (>33,86 ng/ml) en el ingreso para la exacerbación de la EPOC. En un análisis de Kaplan-Meier para evaluar el potencial de niveles de PSP/reg para predecir la mortalidad a corto y largo plazo a los 2 años hubo una diferencia significativa en el riesgo acumulado de muerte en el plazo de 2 años después de la hospitalización para pacientes con niveles más bajos (<18,36 ng/ml), intermedios (18,36-33,86 ng/ml) y más altos de PSP/reg (>33,86 ng/ml), (p<0,001).

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Hospital universitario de Basel LASCCO SA

<120> Método de ensayo de sepsis en seres humanos

40 <130> P1411PC00

<150> 61349909

<151> 2010-05-31

45 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 166

50 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 619 569 T3

Met Ala Gln Thr Ser Ser Tyr Phe Met Leu Ile Ser Cys Leu Met Phe
 1 5 10 15

Leu Ser Gln Ser Gln Gly Gln Glu Ala Gln Thr Glu Leu Pro Gln Ala
 20 25 30

Arg Ile Ser Cys Pro Glu Gly Thr Asn Ala Tyr Arg Ser Tyr Cys Tyr
 35 40 45

Tyr Phe Asn Glu Asp Arg Glu Thr Trp Val Asp Ala Asp Leu Tyr Cys
 50 55 60

Gln Asn Met Asn Ser Gly Asn Leu Val Ser Val Leu Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Gly Ala Phe Val Ala Ser Leu Ile Lys Glu Ser Gly Thr Asp Asp Phe
 85 90 95

Asn Val Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Lys Asn Arg Arg Trp His
 100 105 110

Trp Ser Ser Gly Ser Leu Val Ser Tyr Lys Ser Trp Gly Ile Gly Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Val Asn Pro Gly Tyr Cys Val Ser Leu Thr Ser Ser Thr
 130 135 140

Gly Phe Gln Lys Trp Lys Asp Val Pro Cys Glu Asp Lys Phe Ser Phe
 145 150 155 160

Val Cys Lys Phe Lys Asn
 165

<210> 2
 <211> 166
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

ES 2 619 569 T3

Met Ala Gln Thr Asn Ser Phe Phe Met Leu Ile Ser Ser Leu Met Phe
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Ser Gln Gly Gln Glu Ser Gln Thr Glu Leu Pro Asn Pro
 20 25 30

Arg Ile Ser Cys Pro Glu Gly Thr Asn Ala Tyr Arg Ser Tyr Cys Tyr
 35 40 45

Tyr Phe Asn Glu Asp Pro Glu Thr Trp Val Asp Ala Asp Leu Tyr Cys
 50 55 60

Gln Asn Met Asn Ser Gly Asn Leu Val Ser Val Leu Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Gly Ala Phe Val Ala Ser Leu Ile Lys Glu Ser Ser Thr Asp Asp Ser
 85 90 95

Asn Val Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Lys Asn Arg Arg Trp His
 100 105 110

Trp Ser Ser Gly Ser Leu Val Ser Tyr Lys Ser Trp Asp Thr Gly Ser
 115 120 125

Pro Ser Ser Ala Asn Ala Gly Tyr Cys Ala Ser Leu Thr Ser Cys Ser
 130 135 140

Gly Phe Lys Lys Trp Lys Asp Glu Ser Cys Glu Lys Lys Phe Ser Phe
 145 150 155 160

Val Cys Lys Phe Lys Asn
 165

REIVINDICACIONES

1. Un método *ex vivo* de pronóstico y/o diagnóstico de infecciones de las vías respiratorias inferiores y pulmones en un paciente que comprende determinar el nivel de proteína de cálculos pancreáticos / proteína regeneradora (PSP/reg) en una muestra de líquido corporal de dicho paciente.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende:
- a) determinar el nivel de PSP/reg en dicha muestra;
- b) comparar el nivel de PSP/reg determinado en la etapa a) con un valor de referencia;
- en el que un nivel más alto de PSP/reg determinado en la etapa a), en comparación con el valor de referencia, es indicativo de la gravedad de dicha infección y predictivo del desenlace.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que dicha muestra de líquido corporal es una muestra de suero o una muestra de plasma.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho paciente es un ser humano.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha proteína PSP/reg tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO: 2.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el valor de referencia se obtiene determinando el nivel de PSP/reg en una muestra de líquido corporal de un paciente sin infección.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que el valor de referencia es inferior a 20 ng/ml, más preferentemente el valor de referencia es 10 ng/ml.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la infección de las vías respiratorias inferiores o pulmones está seleccionada del grupo de exacerbación aguda de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y neumonía extrahospitalaria o intrahospitalaria o asociada al respirador.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que un nivel de PSP/reg igual o superior al valor de referencia es indicativo de una infección de las vías respiratorias inferiores y pulmones en dicho paciente.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que un nivel de PSP/reg igual o superior a 150 ng/ml, preferentemente superior a 180 ng/ml, más preferentemente superior a 200 ng/ml, es indicativo de gravedad de la enfermedad y predictivo de mortalidad en un paciente con neumonía adquirida por el respirador (NAR).
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que un nivel de PSP/reg igual o superior a 25 ng/ml es indicativo de microbiología de esputo positiva en un paciente con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el nivel de PSP/reg en dicha muestra de líquido corporal se determina por enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), enzimoimmunoensayo (EIA), espectrometría de masas, o análisis de micromatrices.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el nivel de PSP/reg se determina por un ELISA de sándwich, en el que placas de microtitulación se recubren con un tipo de anticuerpo dirigido contra PSP/reg, entonces se bloquean las placas y la muestra o patrón se carga, se aplica un segundo tipo de anticuerpo contra PSP/reg, entonces se añade un tercer anticuerpo que detecta el tipo particular del segundo anticuerpo conjugado con una marca adecuada, y la marca se usa para cuantificar la cantidad de PSP/reg.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la marca en el ELISA de sándwich es una enzima para la detección cromogénica.

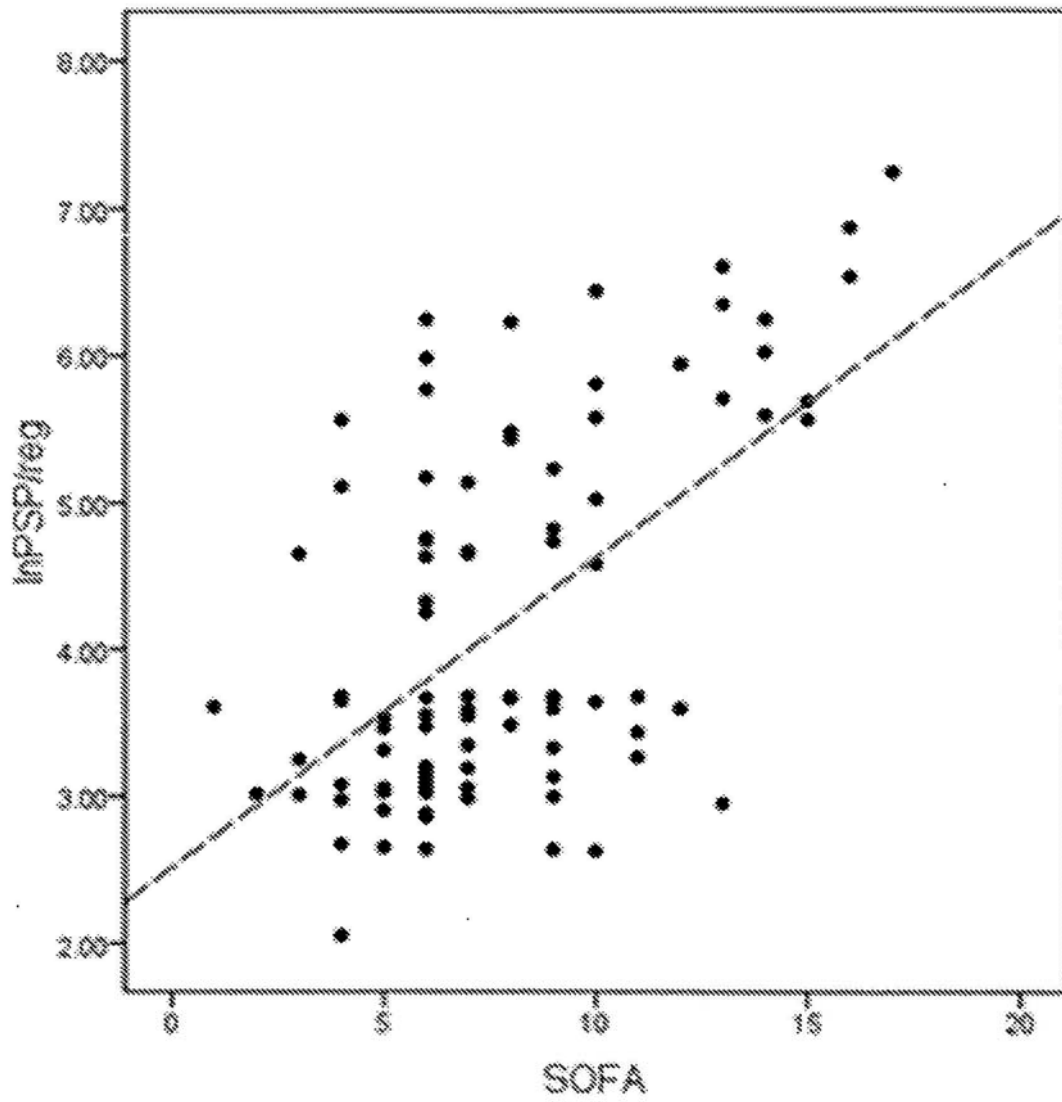


Figura 1

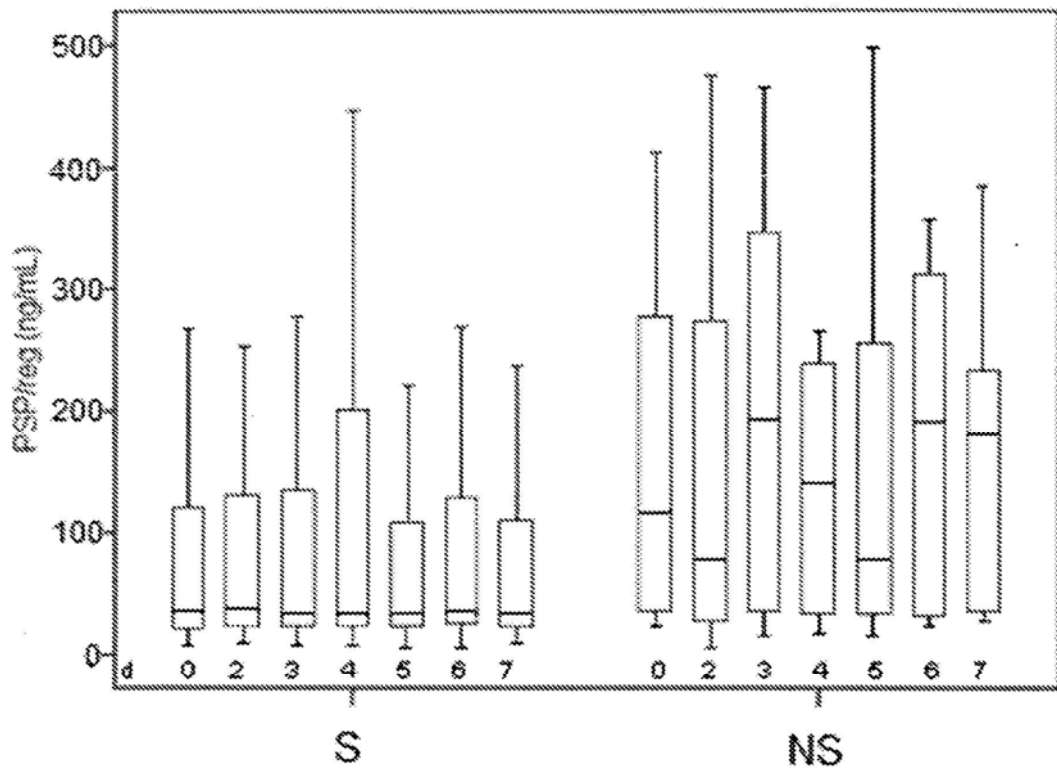


Figura 2

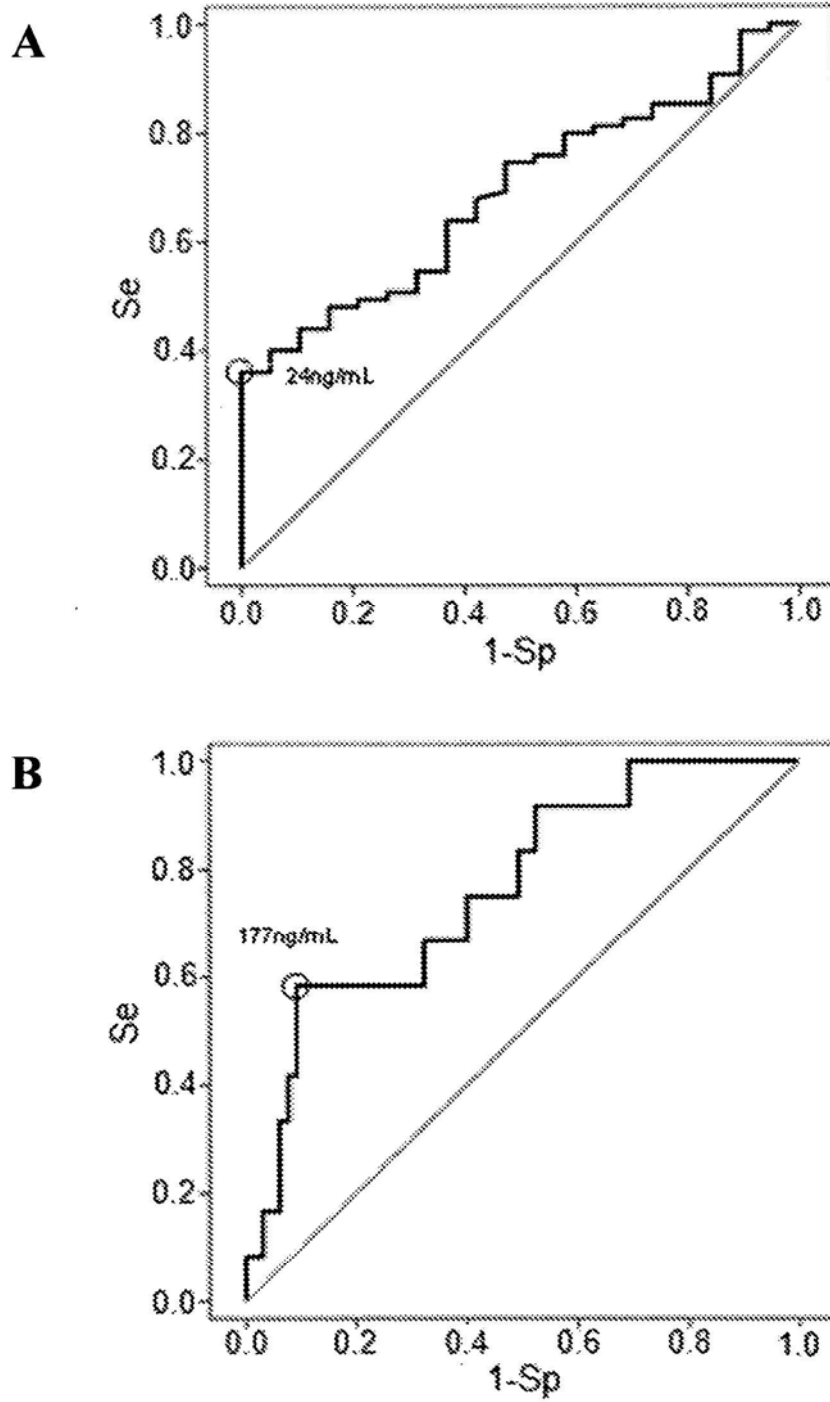


Figura 3

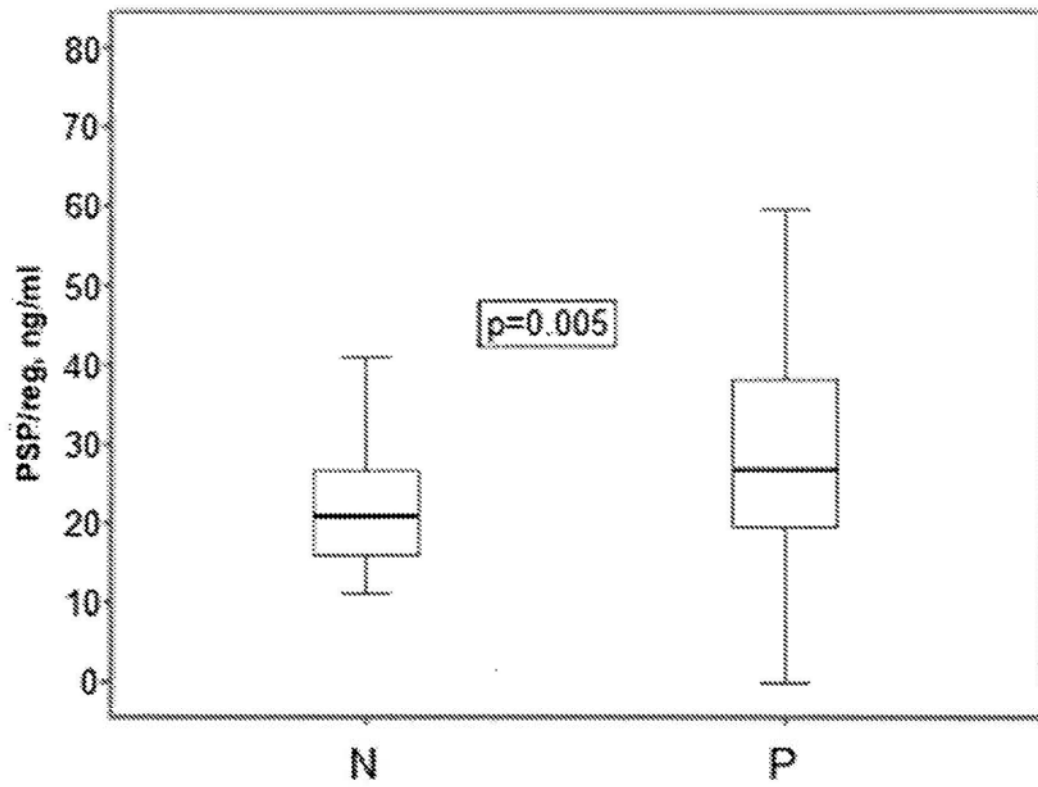


Figura 4